

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات

بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکترای حرفه ای (پزشکی)

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه مرزه روی سلول های رده MCF-7 سرطان پستان

استاد راهنما:

آقای دکتر حسین پیری

استاد مشاور:

آقای دکتر حسن جهانی هاشمی

نگارش:

دکتر سید سپهر زین العابدین نظری

سال تحصیلی:

۹۵-۹۶

تاریخ دفاع:

۱۳۹۵/۱۲/۲۵





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

شماره ثبت: ۱۱۱۰۴

**عنوان :** بررسی اثر عصاره اتانولی گیاه مرزه روی سلول های رده MCF-7 سرطان پستان

**استاد راهنما :** آقای دکتر حسین پیری

**استاد مشاور:** آقای دکتر حسن جهانی هاشمی

**پژوهش و نگارش :** دکتر سید سپهر زین العابدین نظری

#### چکیده :

**مقدمه :** سرطان سینه شایعترین سرطان در بین زنان است و در سال های اخیر در ایران روند رو به رشدی داشته است . درمان های شیمیایی موجود سرطان عوارض زیادی داشته و استفاده از گیاهان دارویی یکی از مفیدترین راه هاست که کمترین عوارض جانبی را ایجاد میکند . گیاه مرزه از خانواده Lamiaceae با توجه به مقادیر بالای ترکیبات آنتی اکسیدانی منبع مناسبی برای استفاده دارویی جهت درمان و جلوگیری از پیشرفت سرطان هاست.

**مواد و روش ها :** پس از جمع آوری نمونه ها عصاره اتانولی تهیه شد. سلول های سرطانی MCF-7 در غلظت های مختلف از عصاره برای ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شد. اثر مهاری عصاره با استفاده از روش های MTT و تریپان بلو بررسی شد تمام داده ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری ANOVA و به دنبال آن آزمون تعقیبی TUKEY آنالیز شد. در تمام آنالیز ها  $P < 0.05$  معنی دار تلقی گردید.

**نتایج و یافته ها:** در تست های MTT و تریپان بلو با افزایش غلظت و زمان میزان آپوپتوز سلولی افزایش پیدا کرد. عصاره اتانولی مرزه علیه سلول های رده MCF-7 سرطان پستان فعالیت ضد سرطانی دارد.

**کلمات کلیدی:** مرزه ، سلول های رده MCF-7 ، سرطان پستان

تقدیم به

تشکر و قدر دانی از

## فهرست مطالب

عنوان

صفحه

۱۱	فصل اول: کلیات
۱۳	۱-۱- بیان مسئله :
۱۴	۲-۱- مقدمه و اهمیت موضوع:
۱۶	۳-۱- کلیات :
۱۷	۴-۱- سرطان سینه :
۱۸	۱-۴-۱- شیوع سرطان سینه در ایران :
۱۹	جدول ۱-۱ - تغییرات میزان بروز سرطان ها در زنان ایرانی از سال ۱۹۶۵ تا ۱۹۹۸ میلادی
۲۰	۲-۴-۱- نقش استروژن در سرطان سینه :
۲۰	۵-۱- سلول های MCF-7 :
۲۱	۱-۵-۱- مشخصات و ویژگی های MCF-7 :
۲۱	جدول ۲-۱ - مشخصات و ویژگی های MCF-7 :
۲۲	۶-۱- خانواده LAMIACAE :
۲۳	۱-۶-۱- مواد شیمیایی موجود در خانواده LAMIACAE :
۲۳	۲-۶-۱- LAMIACAE در ایران :
۲۳	۳-۶-۱- اهمیت خانواده LAMIACAE :
۲۴	۴-۶-۱- اهداف دارویی :
۲۴	۵-۶-۱- مرزه :
۲۵	۱-۵-۶-۱- ترکیبات روغن مرزه :
۲۵	۲-۵-۶-۱- فعالیت آنتی میکروبیال گیاه مرزه :
۲۶	

۲۶	جدول ۳-۱- ترکیبات روغن مرزه با استفاده از روش GC-MS
۲۷	جدول ۴-۱- فعالیت محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر باکتری های مختلف
۲۸	جدول ۵-۱- فعالیت محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر قارچ های مختلف و کاندیدا آلبیکنز به روش DISK INFUSION
۲۹	جدول ۶-۱- معیار MIC محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر قارچ های مختلف و کاندیدا آلبیکنز که با روش AGAR DILUTION امتحان شده است
۲۹	جدول ۶-۱- معیار MIC محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر باکتری های مختلف که با روش MICRODILUTION امتحان شده است
۲۹	۳-۵-۶-۱- فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مرزه :

## ۳۱ فصل دوم: بررسی متون

## ۳۷ فصل سوم: مواد و روش ها

۳۹	۳-۱- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه :
۴۰	۳-۲- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها :
۴۱	۳-۳- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو:
۴۱	۳-۴- سنجش تترازولیوم (MTT) :
۴۲	۳-۵- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:
۴۳	۳-۶- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها :

## ۴۵ فصل چهارم: یافته ها و نتایج

۴۷	۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار ۲۴ ساعته عصاره گیاه مرزه:
۴۸	جدول ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه مرزه
۴۸	۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه مرزه:



جدول ۲-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه مرزه ۴۹

۳-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۲۴ ساعته عصاره گیاه مرزه: ۵۰

جدول ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۲۴ ساعته عصاره گیاه ۵۰

مرزه

۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه مرزه: ۵۱

جدول ۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه ۵۱

۵۲

رزه

## فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۵۳

۵-۱- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گیاه مرزه بر سلولهای سرطانی MCF7: ۵۵

۵-۲- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گیاه مرزه بر سلولهای سرطانی MCF7: ۵۵

۵-۳- نتیجه گیری کلی: ۵۶

۵-۴- پیشنهادات: ۵۶

## فصل ششم: منابع ۵۹

۶-۱- منابع فارسی: ۶۱

۶-۲- منابع انگلیسی: ۶۱



# فصل اول: کلیات



## ۱-۱- بیان مسئله :

در سال های اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بد داشته باشند . بدین جهت توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است . همچنین مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان ، سهم کم تری را در تهیه داروها دارا هستند ولی در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک ، بلادون ، فیزوستیگما ، وینبلاستین و تعدادی دیگر از داروهای ضد سرطان موثر از گیاهان تهیه می شوند . استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کم ترین اثرات جانبی را ایجاد می کند.

## ۱-۲- مقدمه و اهمیت موضوع:

سرطان بیماری است که از تکثیر غیر طبیعی سلول های بدن ناشی می شود . بدن انسان از میلیون ها سلولی ساخته شده است که با یکدیگر گروه بندی شده تا بافت ها و اندام های مختلف را بسازند . ژن های داخل هر سلول به آن دستورهای لازم را صادر می کنند . گاهی اوقات این دستورات در یک سلول مبهم و مغشوش بوده و سلول رفتار غیر طبیعی دارد و پس از مدتی گروهی از سلول های غیر طبیعی می توانند در خون یا سیستم ایمنی گردش کرده یا تبدیل به توده یا تومور بدخیم یا سرطان شوند . در واقع سلول های بدن در طی یک روند تنظیم یافته از بین میروند و سلول های جدید جای آنها را می گیرند گاهی اوقات این روند طبیعی از تنظیم خارج شده و سلول های فرسوده از بین نمی روند و تشکیل توده ای را می نمایند که می توانند تبدیل به تومور بدخیم یا سرطان شوند.

بیش از دویست نوع متفاوت از بیماری سرطان وجود دارد که هر کدام به شیوه های خاص ایجاد می شوند . چیزی که در همه آنها مشترک است این است که همه آنها به روشی مشابه شروع می شوند که تغییر در ساختار طبیعی یک سلول است . تقسیم سلول های غیر طبیعی تحت کنترل نیستند و معلوم نیست که چه زمانی متوقف می شود . یک دسته از سلولهای غیر طبیعی یک تومور نامیده می شود. همه تومورها سرطان نیستند دونهوع تومور وجود دارد ؛ خوش خیم و بد خیم . تومورهای خوش خیم سرطان نیستند . تومورهای بد خیم همان سرطان ها هستند و می توانند به قسمت های مجاور بدن حمله کنند و مانع فعالیت سلول های سالم آن منطقه شوند . در عین حال سلول های تومورهای بدخیم می توانند گسترش یافته و به نقاط دیگر بدن دست اندازی کنند و در

مکانی دور از محل اولیه تجمعاتی از سلول های غیر طبیعی را ایجاد کنند . این مرحله را متاستاز می نامند . در سال ۲۰۰۵ ، در دنیا ۷/۶ میلیون نفر جان خود را به دلیل ابتلا به سرطان از دست داده اند. در سال ۲۰۲۰، شانزده میلیون نفر به سرطان مبتلا می شوند و در همین زمان ، سالانه ده میلیون نفر از این بیماری می میرند . در ده سال آینده در صورتی که اقدامی صورت نگیرد هشتاد و پنج میلیون نفر به دلیل سرطان خواهند مرد . بیش از ۷۰٪ موارد مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای دارای درآمد پایین یا متوسط است . اما مشکل واقعی سرطان بیش تر از این اعداد است چرا که یک سوم بیماران دچار افسردگی و اضطراب در حد بالینی هستند و همچنین به دلیل از دست رفتن درآمد و لزوم تامین مخارج درمان ، آسیب شدیدی به عملکرد اقتصادی خانواده وارد می شود . با این حال ، از سرطان می توان رهایی جست زیرا بیش از ۴۰٪ موارد سرطان قابل پیشگیری هستند و ثلث دیگر بیماران در صورت تشخیص به موقع قابل درمان قطعی می باشند . در بقیه بیماران نیز که غیر قابل درمان هستند ، انجام درمان های حمایتی به بهبود کیفیت زندگی بیماران کمک اساسی خواهد نمود . در آخرین آمار در کشورمان ، سرطان با ۹/۴٪ بعد از گروه بیماریهای دستگاه گردش خون ( ۳۳/۴٪ ) و سوانح مسمومیت و خودکشی ( ۱۳/۴٪ ) به عنوان سومین علت مرگ مطرح گردیده است. در هر سال در کشور حدود صد هزار مورد جدید سرطان بروز می نماید . تفاوت بارزی در نحوه بروز سرطان و الگوی انتشار آن در مناطق مختلف جغرافیایی کشور مشاهده شده است . در برنامه ریزی ملی مبارزه با سرطان ، تحقیقات سرطان دارای نقش اساسی و محوری است . با توجه به هزینه زیاد درمان سرطان در مراحل پیشرفته بیماری ، سرمایه گذاری در امر تحقیقات سرطان از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است [1] .

### ۱-۳- کلیات :

در سال های اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بدی داشته باشند. همچنین به دلیل علاقه مردم به داروهای گیاهی توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است. مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان سهم کمتری را در تهیه داروها دارا هستند در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک , بلادون , فیزوستیگما , وینبلاستین و تعداد دیگری از داروهای ضد سرطان موثر از گیاهان تهیه می شوند . استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کم ترین اثرات جانبی را ایجاد می کند . یکی از سرده های گیاهی که امروزه به دلیل خواص بی شمار آن توجه بسیاری را به خود جلب کرده است و تحقیقات زیادی بر روی آن انجام می گیرد سرده *Artemisia* می باشد و گونه های این سرده در حال حاضر یکی از پر مصرف ترین گیاهان دارویی در سراسر جهان می باشند . به عنوان مثال *Artemisia annua* یکی از ۴ گیاه دارویی با بالاترین میزان ظرفیت جذب رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد . گیاه مرزه یا همان *Tarragon* با نام علمی *Artemisia drucunculus* بعنوان یکی از گونه های مهم این سرده و با توجه به در دسترس بودن آن در تمام نقاط ایران و پیشینه آن در استفاده به عنوان گیاه دارویی به عنوان هدف این تحقیق قرار گرفته است .



#### ۱-۴- سرطان سینه :

سرطان سینه بیشترین سرطانی است که در دنیا تشخیص داده می شود ، چیزی در حدود یک میلیون مورد جدید در هر سال در کل دنیا [1] . همچنین دلیل اصلی مرگ زنان در اثر سرطان در کل دنیا محسوب می شود. در ایالات متحده امریکا بیشترین سرطان در زنان و دومین علت مرگ زنان در اثر سرطان و دلیل اصلی مرگ زنان در سنین بین ۲۰ تا ۵۹ سال است [2] .

در سال ۲۰۰۸ در کل دنیا بیس از ۱,۳۸۴,۰۰۰ مورد جدید سرطان سینه تشخیص داده شد [1] . بیشترین میزان شیوع موارد جدید در امریکای شمالی ، استرالیا ، نیوزلند و غرب و شمال اروپا و کمترین میزان آن در آسیا و مناطق زیر صحرای افریقا [3,4] . احتمالا این تفاوت در بین کشورها و مناطق مختلف با تغییرات جوامع که ناشی از صنعتی شدن کشورهاست ( مثل افزایش مصرف غذاهای چرب ، میانگین وزن ، تغییر سن اولین قاعدگی و یا شیردهی ، تغییر الگوی تولید مثل مانند بارداری های کمتر و سن بالاتر اولین بارداری ) در ارتباط می باشد . مطالعات الگوی مهاجرت به ایالات متحده امریکا بر پایه ی اهمیت فرهنگ و تغییرات محیطی بنا شده است [4] .

در این مطالعات در کل بروز سرطان سینه در نسل دوم مهاجرین بیشتر می شود و حتی این میزان در نسل های سوم و چهارم بیشتر هم می شود [4] . در ایالات متحده امریکا ، موارد جدید سرطان سینه بیش از ۲۳۰,۰۰۰ مورد در هر سال برآورد می شود که مسئول بیش از ۴۰,۰۰۰ فوت در سال است [2] . این میزان از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۷ در حدود ۱/۸٪ کاهش داشته [5] ، که دو فاکتور در این امر دخیل بوده اند :

۱ - توقف هورمون درمانی (HRT)

۲ - افزایش انجام ماموگرافی و غربالگری [6-9]

از این رو احتمالاً ، توقف هورمون درمانی اثر بیشتری دارد [8,10,11] .

#### ۱-۴-۱- شیوع سرطان سینه در ایران :

سرطان سینه شایع ترین سرطان در میان زنان ایرانی است (جدول ۱-۱) [12] . سرطان سینه در ایران نسبت به کشورهای توسعه یافته ، حداقل ۱۰ سال زودتر زندگی زنان را تحت تاثیر قرار می دهد [13] . نرخ مرگ ناشی از سرطان سینه در سال ۱۹۹۸ در تهران ۵/۸ در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر [14] و در سال ۲۰۰۱ ، ۲/۵ نفر در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر و به طور کلی مسئول ۷۷۶۲ سال ، زندگی از دست رفته (بر اساس سن امید به زندگی در ایران) در ۱۸ استان ایران بوده است [15] . کشورهای در حال توسعه امیدوارند که بتوانند سرطان سینه را به عنوان یک تهدید کننده ی جدی حیات جامعه کنترل کنند [16] .

جدول ۱-۱ - تغییرات میزان بروز سرطان ها در زنان ایرانی از سال ۱۹۶۵ تا ۱۹۹۸ میلادی

نوع سرطان	درصد از کل سرطان ها در سال ۱۹۶۵	درصد از کل سرطان ها در سال ۱۹۹۸
Cervix	٪ ۱۹/۷	٪ ۵/۵
Breast	٪ ۱۲/۶	٪ ۲۵/۳
Esophagus	٪ ۶/۲	٪ ۳/۹
Lymphoma	٪ ۴/۲	٪ ۳/۲
Corpus Uteri	٪ ۳/۲	٪ ۲/۲

سرطان سینه ، مسئول ۲۵/۳ درصد از تمام سرطان های زنان در سال ۱۹۹۸ در تهران بوده است [17] . بنیاد ملی سرطان گزارش داده که در سال ۲۰۰۰ ، ۱۶۰۳ مورد جدید و در سال ۲۰۰۳ ، ۳۹۴۶ مورد جدید و در سال ۲۰۰۴ ، ۴۵۵۷ مورد جدید از سرطان سینه داشته ایم و این روند صعودی همچنان ادامه دارد [12] .

در مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ توسط موسوی و همکاران ، روی اپیدمیولوژی سرطان سینه در ایران ، در بین بیمارانی با بازه سنی ۱۵ تا ۸۵ سال که بیشترین تعداد بیماران متعلق به بازه سنی ۴۰ تا ۴۹ سال بوده ، میزان بروز سرطان سینه در زنان بیش تر از ۳۰ سال در ایران ۲۲ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر و میزان شیوع این بیماری در همین جامعه ۱۲۰ مورد در هر ۱۰۰،۰۰۰ نفر گزارش شده است [18] .

#### ۱-۴-۲- نقش استروژن در سرطان سینه :

در کنار سن و ژنتیک ، بیشترین عوامل خطر برای سرطان سینه ، به افزایش میزان استروژن در بدن و قرار گرفتن در معرض آن (چه به صورت اندوژن و چه به صورت اگزوژن) مرتبط است [19].

عوامل خطر سرطان سینه که به استروژن مرتبط هستند طی بیوپسی های انجام شده ، افزایش دانسیته سینه و همچنین افزایش تراکم استخوان را نشان می دهند [20].

هورمون تراپی با استروژن و پروژسترون طی یک دوره ۵/۲ ساله در WHI مورد مطالعه قرار گرفت که در گروه دریافت کننده استروژن و پروژسترون نسبت به گروهی که دارونما دریافت کرده بود ، با افزایش بروز سرطان سینه و همچنین با افزایش مرگ در اثر سرطان سینه روبرو شدند [21]. این افزایش ریسک سرطان سینه و مرگ در اثر آن ، در یک پیگیری ۱۱ ساله ، به طور میانگین همچنان ادامه پیدا کرد [22].

#### ۱-۵- سلول های MCF-7 :

MCF-7 یک لاین سلولی از سرطان سینه است که در سال ۱۹۷۰ از یک زن ۷۹ ساله ی قزاقستانی جدا شده است. MCF-7 مخفف Michigan Cancer Foundation 7 است که به موسسه ای در دیترویت ایالات متحده امریکا بر میگردد که در آن دکتر هربرت سول و همکارانش برای اولین بار این لاین سلولی را جدا کردند [23].

قبل از جداسازی و کشف MCF-7، امکان تعیین یک لاین سلولی از سرطان سینه که قادر به زنده ماندن بیشتر از چند ماه باشد برای محققان سرطان وجود نداشت [24].

## ۱-۵-۱- مشخصات و ویژگی های MCF-7:

### جدول ۱-۲ - مشخصات و ویژگی های MCF-7:

Invasive Ductal Carcinoma	تومور اولیه
Pleural Effusion	منشا سلولی
دارد	گیرنده استروژنی
دارد	پاسخ تکثیر شونده در معرض استروژن
دارد	گیرنده پروژسترونی
ندارد	ژن هم افزایی ERBB2 (با بیان HER2/neu pro)
فقط همراه با مکمل استروژنی دارد	قابلیت ایجاد تومور در موش
Luminal Epithelial	فنوتیپ سلولی

این لاین سلولی خصوصیات متعددی از اپیتلیوم تمایز یافته ی پستان دارد که شامل :

۱. توانایی ایجاد استرادیول با گیرنده های سیتوپلاسمی استروژن

۲. قابلیت ایجاد توده

TNF- $\alpha$  از رشد و تکثیر سلول های MCF-7 جلوگیری می کند و درمان با آنتی استروژن ها می تواند ترشح پروتئین های متصل شونده IGF را تنظیم کند و از رشد سلول بکاهد .

رده سلولی MCF7 از جمله رده سلولی سرطان سینه است که به استروژن حساس است و استروژن رسپتور آلفا (ER- $\alpha$ ) و استروژن رسپتور بتا (ER- $\beta$ ) را بیان می کند. مجاورت سلول های MCF7 با مواد شیمیایی گیاهی بطور موثری از پیشرفت سیکل سلولی که با استروژن تحریک شده و توسط ۱۷-بتا استرادیول القاء شده است را بلوکه می کند. بیشتر سرطان های سینه استروژن رسپتور آلفا را بیان می کنند و استروژن پرولیفراسیون سلولهای اپیتلیال پستان را القاء می کند [23,25-29].

## ۱-۶- خانواده Lamiaceae :

خانواده Lamiaceae یکی از بزرگ ترین و بارزترین خانواده های گیاهی با حدود ۲۲۰ گونه و تقریباً ۴۰۰۰ زیرگونه در سراسر جهان است . این خانواده تقریباً انتشار جهانی دارد [30-32]. بیش ترین شهرت خانواده Lamiaceae به علت روغن اعضای این خانواده است که از تعداد زیادی از اعضای این خانواده روغن تهیه می

شود و از روغن خیلی از آن ها استفاده می شود . این گیاهان به طور یقین از دوران ما قبل تاریخ مورد استفاده قرار می گیرند . شواهد حفاری های باستان شناسی بعضی از گونه های این خانواده را نشان می دهد که این روزها فقط به عنوان گیاه وحشی شناخته می شوند که در تمدن های باستان در مقیاس محلی استفاده می شدند [33].

#### ۱-۶-۱- مواد شیمیایی موجود در خانواده **Lamiaceae** :

این خانواده شامل مواد شیمیایی متنوعی هستند . طیف گسترده ای از ترکیبات شیمیایی مثل ترپنوئیدها ، ایریدیوئیدها ، ترکیبات فنولیک و فلاوونوئیدها در اعضای این خانواده گزارش شده اند [34-36]. ترپنوئیدهای با زنجیره ی کوتاه عامل بو و مزه ی روغن این گیاهان هستند [34].

#### ۱-۶-۲- **Lamiaceae** در ایران :

با ۴۶ گونه و ۴۱۰ زیرگونه **Lamiaceae** تنوع و انتشار وسیع و قابل توجهی در ایران دارد . از این گونه ها ۱۲۴ زیرگونه ( یعنی حدود ۳۰ درصد ) در ایران اندمیک هستند [30-32,37].

#### ۱-۶-۳- اهمیت خانواده **Lamiaceae** :

اعضای این خانواده برای اهداف مختلفی استفاده می شوند ولی میتوانیم این اهداف را در سه گروه کلی تقسیم بندی کنیم :

۱. اهداف دارویی که مورد توجه ما نیز هست

۲. اهداف تزئینی

۳. به عنوان گیاه معطر که به عنوان گیاه مورد استفاده در آشپزی ، به عنوان سبزیجات خام و به

عنوان گیاه مورد استفاده در صنعت عطر سازی [38]

#### ۱-۶-۴- اهداف دارویی :

خیلی از گونه های این خانواده در داروهای سنتی و حتی امروزی استفاده می شوند و تحقیقات اخیر اساس استفاده دارویی از آن ها را تایید کرده است . استفاده های متنوع و گوناگونی از خانواده در نقاط مختلف جهان می شود که بیش تر از ۸۱ گونه به صورت مستند در ایران مورد استفاده های دارویی قرار می گرفتند که تعداد زیادی از آن ها به صورت طبیعی در ایران رشد نمی کنند [38].

#### ۱-۶-۵- مرزه :

گیاه مرزه با نام علمی *Satureja Hortensis* یا *Summer Savory* از خانواده ی *Lamiaceae* یک گیاه معطر و دارویی کاملاً شناخته شده می باشد . برگ ها گل و ساقه ی آن به شکل چای یا افزودنی به عنوان ادویه برای غذا استفاده می شود [39]. همچنین مرزه به عنوان داروی سنتی برای درمان مشکلات مختلف مثل دردهای عضلانی ، تهوع ، سوء هاضمه ، اسهال و بیماری های عفونی استفاده می شود . این گیاه خواص بسیاری دارد که موارد زیر تعدادی از مهم ترین آن ها هستند :

- خواص ضد اسپاسم



- خواص ضد اسهال
- خواص آنتی اکسیدانی
- آرام بخشی
- خواص آنتی میکروبیال [40-44]

#### ۱-۵-۶-۱- ترکیبات روغن مرزه :

با آنالیز به روش های GC-FID و GC-MS ۲۲ ترکیب که ۹۸/۸ درصد تا ۹۹/۹ درصد روغن خام مرزه را تشکیل می دهند که از بخش های خشک شده گیاه به دست آمده اند (جدول ۱-۳) [40].

#### ۱-۵-۶-۲- فعالیت آنتی میکروبیال گیاه مرزه :

در یک مطالعه عصاره متانولی مرزه در دو نوع قطبی و غیر قطبی و روغن مرزه در مقابل ۲۳ گونه باکتریایی مورد آزمایش قرار گرفت که عصاره متانولی غیر قطبی در مقابل ۵ گونه فعالیت نشان داد که شامل موارد زیر اند :

۱. *Bacillus Subtilis*
۲. *Enterococcus Fecalis*
۳. *Pseudomonas Aeruginosa*
۴. *Salmonella Enteritidis*
۵. *Streptococcus Pyogenes*

اگر چه هیچ عمومی نمی توان قائل شد ولی محصولات غیر قطبی مرزه در خیلی از موارد فعالیت بهتری از انواع قطبی دارند [45]. فعالیت مشاهده شده در فاز غیر قطبی را می توان به حضور ترکیبات فنولی نسبت داد

[46]. از سوی دیگر روغن مرزه توان آنتی میکروبیال بالایی در مقابل همه ۲۳ گونه باکتریایی و ۱۵ گونه قارچی

و آغازی مورد مطالعه، از خود نشان داد (جدول ۴-۱، ۵-۱، ۶-۱، ۷-۱) [47].

جدول ۳-۱- ترکیبات روغن مرزه با استفاده از روش GC-MS

no.	KI <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	components	composition (%)
1	930	9.444	thujene	0.8
2	939	9.722	$\alpha$ -pinene	3.0
3	979	11.654	$\beta$ -pinene	2.5
4	991	12.418	$\beta$ -myrcene	1.4
5	1003	12.983	$\alpha$ -phellandrene	0.3
6	1017	13.607	$\alpha$ -terpinene	2.7
7	1025	14.073	<i>p</i> -cymene	10.0
8	1037	15.262	$\beta$ -ocimene	0.1
9	1060	15.956	$\gamma$ -terpinene	21.5
10	1089	17.175	terpinolene	0.1
11	1165	21.041	borneol	0.3
12	1177	21.626	terpinen-4-ol	0.3
13	1237	25.769	pulegone	0.1
14	1253	26.908	anethole	0.5
15	1290	27.721	thymol	28.9
16	1299	28.266	carvacrol	26.1
17	1352	30.179	thymol acetate	0.3
18	1373	30.992	carvacrol acetate	0.1
19	1419	33.074	caryophyllene	0.4
20	1441	33.906	aromadendrene	0.1
21	1500	36.394	bicyclogermacrene	0.2
22	1506	36.890	$\beta$ -bisabolene	0.1
			total	98.8

<sup>a</sup> KI, Kovats index relative to *n*-alkanes on nonpolar DB-5 column (32).

<sup>b</sup> Retention time (in minutes).

جدول ۱-۴- فعالیت محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر باکتری های مختلف

bacterial species	inhibition zone in diameter (mm) around the disks impregnated with 10 $\mu$ L of essential oil and extracts (300 $\mu$ g/disk)					
	essential oil (10 $\mu$ L/disk)	methanol extracts from plants		MeOH		standard antibiotic disks <sup>b</sup>
		polar	nonpolar	callus culture <sup>a</sup>	negative control	
<i>Acinetobacter baumannii</i> -A8	19					18 (OFX)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -142	24					27 (SCF)
<i>Bacillus cereus</i> -RK75	26					30 (OFX)
<i>Bacillus macerans</i> -M58	26					19 (OFX)
<i>Bacillus megaterium</i> -M3	24					9 (SCF)
<i>B. subtilis</i> -ATCC-6633	21		16			28 (OFX)
<i>Brucella abortus</i> -A77	5					12 (SCF)
<i>Burkholdria cepacia</i> -PR-1217	12					22 (SCF)
<i>Clavibacter michiganense</i> -A227	26					25 (SCF)
<i>Enterobacter cloacae</i> -A135	18					20 (NET)
<i>E. fecalis</i> -ATCC-29122	21		9			18 (SCF)
<i>Escherichia coli</i> -Hak59	13					(OFX)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> -A137	23					12 (OFX)
<i>Proteus vulgaris</i> -A161	18					12 (OFX)
<i>P. aeruginosa</i> -ATCC-9027	27		11			22 (NET)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> -RK242	29					10 (OFX)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i> -A35	17					24 (OFX)
<i>S. enteritidis</i> -IK27	18		16			27 (SCF)
<i>Staphylococcus aureus</i> -ATCC-29213	22					22 (SCF)
<i>Staphylococcus epidermis</i> -A233	18					(SCF)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> -IK3	21					(OFX)
<i>S. pyogenes</i> -ATCC-176	16		11			10 (OFX)
<i>Xanthomonas campestris</i> -A235	15					20 (SCF)
total of 23 bacterial species		5-29		9-16		

<sup>a</sup> MeOH = methanol extract. <sup>b</sup> OFX = ofloxacin (10  $\mu$ g/disk); SCF = sulbactam (30  $\mu$ g) + cefoperazona (75  $\mu$ g) (105  $\mu$ g/disk); and NET = netilmicin (30  $\mu$ g/disk) were used as positive reference standards antibiotic disks (Oxoid).

جدول ۱-۵- فعالیت محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر قارچ های مختلف و کاندیدا آلبیکنز به روش Disk infusion

inhibition zone in diameter (mm) around the disks impregnated with 10 $\mu$ L of essential oil and extracts (300 $\mu$ g/disk)						
yeast and fungi species	essential oil (10 $\mu$ L/disk)	methanol extracts from plants		MeOH		standard antibiotic disks <sup>b</sup>
		polar	nonpolar	callus culture <sup>a</sup>	negative control	
			yeast			
<i>C. albicans</i> -A117	20					(NET)
			fungi			
<i>Alternaria alternata</i>	27					(NET)
<i>Aspergillus flavus</i>	37					(NET)
<i>Aspergillus varicolor</i>	27					(NET)
<i>Fusarium culmorum</i>	33					(NET)
<i>Fusarium oxysporum</i>	26					(NET)
<i>Penicillium</i> spp.	31					(NET)
<i>Rhizopus</i> spp.	23					(NET)
<i>Rhizoctonia solani</i>	25					(NET)
<i>Moniliania fructicola</i>	30					(NET)
<i>Trichophyton rubrum</i>	19					(NET)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	17					(NET)
<i>Microsporum canis</i>	21					(NET)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	29					(NET)
<i>Sclerotinia minor</i>	25					(NET)
total 15 isolates	17–37					

<sup>a</sup> MeOH = methanol extract. <sup>b</sup> OFX = ofloxacin (10  $\mu$ g/disk); SCF = sulbactam (30  $\mu$ g) + cefoperazone (75  $\mu$ g) (105  $\mu$ g/disk); and NET = netilmicin (30  $\mu$ g/disk) were used as positive reference standards antibiotic disks (Oxoid).

جدول ۱-۷- معیار MIC محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر قارچ های مختلف و کاندیدا آلیکنز که با روش Agar dilution امتحان شده است

bacteria species	essential oil	standard drug (Amphotericin B)
<i>C. albicans</i> -A117	yeast 250	31.25
<i>A. alternata</i>	fungi 62.5	15.62
<i>A. flavus</i>	31.25	15.62
<i>A. variegata</i>	125	62.5
<i>F. culmorum</i>	125	31.25
<i>F. oxysporum</i>	250	62.5
<i>Penicillium spp.</i>	125	31.25
<i>Rhizopus spp.</i>	250	
<i>R. solani</i>	125	31.25
<i>M. fructicola</i>	31.25	15.62
<i>T. rubrum</i>	31.25	15.62
<i>T. mentagrophytes</i>	62.5	31.25
<i>M. canis</i>	62.5	15.62
<i>S. sclerotiorum</i>	125	62.5
<i>S. minor</i>	250	125
	31.25-250	15.62-125

جدول ۱-۶- معیار MIC محصولات مرزه در فازهای قطبی و غیر قطبی در برابر باکتری های مختلف که با روش Microdilution امتحان شده است

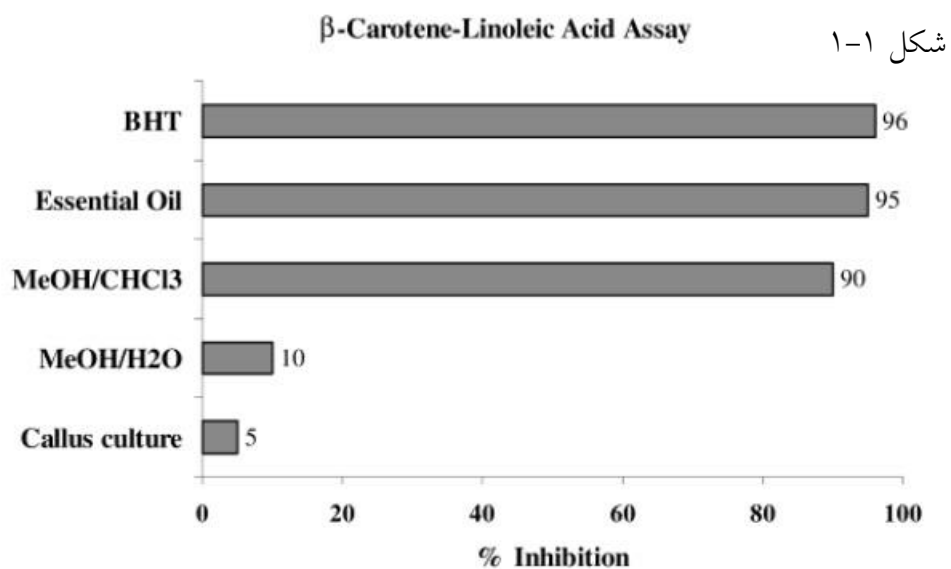
bacteria species	MeOH extract		
	essential oil	nonpolar subfraction	standard drug (Maxipime)
<i>A. baumannii</i> -A8	125		31.25
<i>B. amyloliquefaciens</i> -142	62.5		15.62
<i>B. cereus</i> -RK75	125		31.25
<i>B. macerans</i> -M58	125		15.62
<i>B. megaterium</i> -M3	125		15.62
<i>B. subtilis</i> -ATCC-6633	31.25	250	7.80
<i>B. abortus</i> -A77	500		62.5
<i>B. cepacia</i> PR-1217	500		125
<i>C. michiganense</i> -A227	62.5		15.62
<i>E. cloacae</i> -A135	250		31.25
<i>E. faecalis</i> -ATCC-29122	125	500	31.25
<i>E. coli</i> -Hak59	250		62.5
<i>K. pneumoniae</i> -A137	62.5		125
<i>P. vulgaris</i> -A161	250		125
<i>P. aeruginosa</i> -ATCC-9027	31.25	250	31.25
<i>P. fluorescens</i> -RK242	62.5		31.25
<i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i> -A35	250		125
<i>S. enteritidis</i> -IK27	125	500	62.5
<i>S. aureus</i> -ATCC-29213	125		31.25
<i>S. epidermis</i> -A233	125		15.62
<i>S. pneumoniae</i> -IK3	62.5		31.25
<i>S. pyogenes</i> -ATCC-176	250	500	62.5
<i>X. campestris</i> -A235	125		31.25
	31.25-500	250-500	7.80-125

### ۱-۶-۵-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مرزه :

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره و روغن مرزه نشان می دهد که اثر محافظتی قوی ای در مقابل ROS دارد و می تواند به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و یا صنایع دارویی استفاده شود (جدول ۱-۸ و شکل ۱-۱) [47].

جدول ۱-۸- تاثیر محصولات مرزه روی DPPH در محیط *in vitro*

sample	DPPH
the oil	350.00 ± 5.00
water subfraction of MeOH extract	30.89 ± 0.80
chloroform subfraction of MeOH extract	86.26 ± 0.50
callus culture (MeOH extract)	23.76 ± 0.80
BHT (positive control)	19.80 ± 0.50



# **فصل دوم:**

## **بررسی متون**





اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها و ممانعت از رشد باکتری ها ی پاتوژن به خوبی شناخته شده است . ولی با وجود تنوع بسیار زیادی که این نوع گیاهان چه در سطح جهانی و یا منطقه در کشور دارند و همچنین ظهور بیماری ها و عوامل بیماری زای جدید مطالعه و تحقیق در این مورد ادامه دارد . با صنعتی شدن جوامع بشری شمار مبتلایان به سرطان رشد چشمگیری داشته و استفاده از دارو های ضد سرطان در درمان بیماران مبتلا به سرطان کاربرد وسیعی پیدا کرده است [48]. پلی فنل ها انواعی از آنتی اکسیدان ها هستند که در جلوگیری از بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان نقش دارند . این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات متفاوت دارند. ترکیبات فنلی شامل ویتامین ها , رنگدانه ها و فلاونوئید ها , ویژگیهای ضد جهشی و در نتیجه ضد سرطانی و همچنین فعالیت کاهش قند خون را دارند [49] سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله میباشد. این سرطان عامل سی درصد درصد تمام سرطان های زنان و بیست درصد مرگ و میر ناشی از سرطان می باشد . شیوع سرطان پستان در کشور های در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع ترین بیماری بدخیم در بانوان در آمده است . به طوری که آمار جهانی نشانگر ابتلای سالانه یک و نیم میلیون نفر در سراسر جهان بوده و میزان مرگ و میر ناشی از آن سالانه ۵۰۲۰۰۰۰۰ گزارش کرده اند . سرطان پستان در ایران کمتر از نقاط دیگر آسیا بوده است . در حالی که در طی دهه های اخیر شیوع این سرطان در زنان ایرانی رشد بالایی داشته است که نگران کننده می باشد . علاوه بر آن در زنان ایرانی حداکثر سن ابتلا به سرطان پستان حدود یک دهه کمتر از زنان در کشورهای پیشرفته می باشد . شیمی درمانی یکی از مهم ترین روش های درمانی برای سرطان می باشد . اثرات جانبی یکی از ملاحظات عمده طب غربی برای ترکیبات ضد تومور می باشد . با وجود اینکه پزشکی گیاهی یک امتیاز قابل تحسین بر ترکیبات صناعی دارد برای آنکه آنها دارای عناصر طبیعی هستند و اثرات منفی کمتری دارند [50]. مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد میکنند که مواد

غذایی غنی از میوه ها و سبزیجات بر روی سرطان های مختلف از جمله سرطان کلون اثر باز دارنده دارند [51]. امروزه یکی از بهترین آنتی اکسیدانهای طبیعی ، ترکیبات فنلی گیاهان می باشند [52]. آنتی اکسیدانهای پلی فنلی یک گروه ویژه از متابولیت های ثانویه را تشکیل می دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت ها در مقابل اثرات اکسید کنندگی رادیکال های آزاد اکسیژن و سایر گونه های فعال ایفا میکنند ، به طوری که از بروز بیماری های متعددی از جمله بیماری های التهابی ، سرطان ، دیابت ، سکته قلبی ، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری می نماید [53-54].

مرزه با توجه به استفاده سنتی برای درمان مشکلات مختلف مثل دردهای عضلانی ، تهوع ، سوء هاضمه ، اسهال و بیماری های عفونی استفاده می شود و با توجه به خواص گسترده از جمله خواص ضد اسپاسم ، خواص ضد اسهال ، آرام بخشی ، خواص آنتی میکروبیال و به خصوص خواص آنتی اکسیدانی و اینکه عصاره مرزه شامل مشتقات فلاونوئیدی است که در غلظت های بالا وجود دارد می تواند منبع مناسبی برای تولید داروهای ضد سرطان با پایه ی گیاهی باشد [40-44]. تحقیقاتی که تا کنون روی اثرات ضد سرطانی انواع گونه های Satureja و به خصوص مرزه انجام شده و همچنین تحقیقاتی با هدف متفاوت ولی مرتبط انجام شده در زیر آورده شده است :

مدسن و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی مرزه در حالت محلول مطالعه کرده اند. با اضافه کردن ۰/۱۵ درصد از برگ خشک گیاه مشاهده کرد که به صورت مشخصی اثر حفاظتی آنتی اکسیداتیو آن بهتر از اضافه کردن ۸۰ ppm پروپیل گالات (غلظت استاندارد این نوع محصول) در طول نگهداری در فضای تاریک

در دمای ۱۹ درجه سانتی گراد تا ۲۴ هفته است. از سوی دیگر اضافه کردن عصاره متانولی یخ زده مرزه در یک غلظت معادل فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری دارد اما همچنان با فعالیت آنتی اکسیدانی پروپیل گالات قابل مقایسه است. بر خلاف این مسئله عصاره گیاه که در طول مدت نگهداری تحت تابش نور فلوروسنت (850 lux) قرار گرفته بود هیچ فعالیت محافظتی آنتی اکسیداتیو نداشت و در واقع یک اثر پرواکسیداتیو مشاهده شد [55].

دورمان و هیلتونن و همکاران در سال ۲۰۰۵ خواص آنتی اکسیدانی مرزه و عصاره و زیر مجموعه هایش را با ارزیابی ظرفیت کاهش  $Fe^{3+}$  به  $Fe^{2+}$  بررسی کردند. روش های مورد استفاده آن ها DPPH و ABTS و روش پاکسازی رادیکال های آزاد با هیدروکسیل بود. عصاره خام گیاه فعالیت امیدوارکننده ای در محیط *in vitro* نشان داد ، بنابراین زیر مجموعه های دیگری نیز وجود داشت. محلول اتیل استات گیاه به عنوان موثرترین محصول گیاه از نظر قدرت آنتی اکسیدانی شناخته شد [56].

وثوق قنبری و همکارانش در سال ۲۰۰۸ و همچنین در مطالعه مشابه دیگری در سال ۲۰۱۰ اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی هایپرلیپیدمیک و آنتی دیابتیک گونه *Satureja khuzestanica* را مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه حاصله نشان داد که کاهش معنی داری در میزان کلسترول (کاهش LDL-C و افزایش HDL-C ) ایجاد می شود و میزان TAP نیز اندازه گیری شد [57].

دیکباس و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد قارچی روغن و عصاره متانولی مرزه را در برابر آسپرژیلوس فلاووس بررسی کردند و نتایج نشان داد که روغن مرزه فعالیت قوی ضد قارچی علیه پاتوژن مذکور دارد [58].

رزاقی و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر بازدارندگی روغن مرزه را روی رشد و آفلاتوکسین تولید شده توسط آسپرژیلوس پاراسایتیکوس ارزیابی کرد و نتایج به صورتی شفاف اثر قدرتمند بازدارندگی مرزه از تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس را نشان داد [59].

فتحی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گونه *Satureja hortensis* را بررسی کردند و نتایج نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره گونه *Satureja hortensis* با افزایش غلظت افزایش می یابد و قادر است از فرآیندهای اکسیداسیون جلوگیری کند [60].

ککر و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اثرات آنتاگونیستی روغن مرزه را در مقابل آفلاتوکسین B1 (AFB1) در محیط *in vitro* در لنفوسیت های انسانی بررسی کرد که اثرات ضد موتاسیونی و آنتی ژنوتوکسیک روغن مرزه با روش SCE (Sister Chromatid Exchange) و تست میکرونوکلئ (MN) علیه AFB1 بررسی شد به علاوه با اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و گلووتاتیون پراکسیداز (GPx) اثر آنتی اکسیدانی روغن گیاه مرزه بررسی شد. نتایج واضحاً نشان داد که روغن مرزه اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی ژنوتوکسیک قوی ای دارد [61].

# **فصل سوم:**

## **مواد و روش ها**



## روش اجرا و طراحی تحقیق

نمونه های گیاهی جمع آوری شد و از هر کدام نمونه های هرباریومی تهیه گردید و سپس مورد شناسایی قرار گرفت. ما بقی نمونه ها برای شناسایی آلکالوئید ، فلاونوئید و آزمایشات ضد سرطانی آماده شد.

### ۳-۱- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه :

در این تحقیق از اتانول ۷۰ درجه و روش پرکولا سیون استفاده شد . بدین ترتیب که پنجاه گرم از پودر نمونه های گیاهی مورد نظر را داخل دکانتور ریخته سپس مرحله به مرحله به آن اتانول ۷۰ درجه اضافه نمودیم . برای اضافه کردن اتانول ابتدا آن را گرم و سپس به داخل دکانتور انتقال دادیم . افزودن اتانول را تا جایی ادامه دادیم که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شد . برای عصاره گیری کامل بسته به نوع اندام (برگ ، ساقه ، ریشه) مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت زمان لازم بود . در این حالت پودر گیاه بهتر می تواند حلال را در خود جذب نماید تا حد اکثر مواد موثره در اتانول حل شود . پس از عصاره گیری عمل جدا سازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری انجام شد .

رقیق سازی عصاره گیاهان : هر یک از عصاره ها را با پروپیلن گلیکول رقیق کرده و علاوه بر عصاره خالص ، غلظت های ۲۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر از عصاره تهیه شد .

**شناسایی فلاونوئید ها :** یک گرم پودر گیاهی با ده میلی لیتر متانول به مدت ده دقیقه رفلاکس و صاف گردید و سپس با آب رقیق و با پترولیوم اتر دکامنه شد . فاز زیرین تغلیظ و در اتیل استات حل و جهت آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت .

**آزمایش ویل سون تابوک :** یک قسمت نمونه تهیه شده تغلیظ و ده قطره استن و اسید بوریک و اسید اگزالیک مجدداً تغلیظ و زیر لامپ UV قرار گرفت ظهور رنگ زرد که نشانه وجود فلاونوئید است مشاهده گردید . شناسایی آلکالوئید نیز با استفاده از معرف مایر شناسایی شد.

### ۳-۲- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها :

بررسی خواص ضد سرطانی رقت های مختلف عصاره گیاه دارویی مرزه با استفاده از لاین سلولی و مطابق پروتکل زیر انجام شد رده سلولی MCF7 که مشتق از سرطان پستان است , از بانک سلولی انسیتوپاستور ایران تهیه شد . سلول ها در محیط High glucose DMEM حاوی ده درصد سرم جنین گاو , پنج درصد اسید های آمینه غیر ضروری و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی دی اکسید کربن پنج درصد کشت شد . بررسی های مورد نیاز بر روی رده سلولی تازه از ازلت مایع خارج شده انجام گردید.



### ۳-۳- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو:

تعداد  $1 \times 10^4$  سلول در هر ول کشت شد و سپس پلیت ۲۴ ساعت به منظور اتصال سلول ها به کف پلیت در انکوباتور قرار گرفت. محیط رویی سلول ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی غلظت های ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره مرزه به هر چاهک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید. پس از مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت، تمام خانه های پلیت تریپسین زنی شد. سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل، تریپسین غیر فعال شد و نسبت یک به یک تریپان بلو چهار درصد به هر خانه اضافه گردید و پلیت به مدت دو دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار (در خانه های متعلق به شمارش گلبول های سفید) انجام گرفت. سلول های رنگ نگرفته به عنوان سلول های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول ها در غلظت محاسبه شد.

$$100 \times \text{تعداد کل سلولها} / \text{تعداد سلولهای زنده} = \text{توانایی زیستی سلولها}$$

### ۳-۴- سنجش تترازولیوم (MTT):

اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده و تولید بلور های بنفش رنگ و نامحلول فورمازان است. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود و بالعکس. برای انجام این تست تعداد ده هزار سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دوبار توسط PBS شسته شد. سپس صد میکرو لیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت های ۲۵،

۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره مرزه به هر چاهک پلیت اضافه و پلیت به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با صد میکرولیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین گردید. به هر یک از چاهک ها ده میکرولیتر محلول MTT با غلظت پنج میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان صد میکرولیتر دی متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک دیگر منتقل و جذب نوری OD هر چاهک در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا (ELISA reader) قرائت و درصد حیات سلول ها در مورد هر غلظت محاسبه شد.

### ۳-۵- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

روش نمونه گیری به روش میدانی (جمع آوری گیاهان دارویی) بود. همچنین رده سلولی MCF7 که مشتق شده از سلولهای سرطان پستان موش می باشد جهت بررسی اثر متغیر مستقل (زمان و غلظت عصاره های گیاه مرزه) بر متغیر وابسته (سلولهای سرطانی مذکور) استفاده گردید.

گروه های مورد مطالعه : گروه های سلولی مورد مطالعه شامل موارد زیر است.

گروه ۱: گروه کنترل منفی (سلول هایی که عصاره دریافت نکردند)

گروه ۲: گروه کنترل مثبت (سلول هایی که عصاره دریافت نکردند و در زمان انجام تست به آنها آنزیم سیس پلاتین افزوده گردید)

گروه ۳: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 25 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۴: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 50 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۵: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 100 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۶: گروه تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 150 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۷: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 25 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۸: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 50 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۹: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 100 mg/ml دریافت کردند)

گروه ۱۰: گروه تیمار ۳۶ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 150 mg/ml دریافت کردند)

تست های آزمایشگاهی مختلف ذکر شده برای تمامی گروه ها به صورت تریپلیکیته انجام شد .

### ۳-۶- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها :

داده های به دست آمده با برنامه نرم افزاری SPSS و به کمک آزمونهای آماری ANOVA در گروههای مورد مطالعه ، تعیین و داده ها از نظر آماری با تستهای پارامتری و ناپارامتری مورد بررسی قرار گرفت . داده های حاصل از آزمایشهای مربوط به تیمار سلولهای کشت شده در زمانها و غلظت های مختلف به دلیل توضیح

نرمال با استفاده از آزمون پارامتری آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس به کمک آزمونهای تعقیبی Post Hoc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت . بر این اساس تمامی نتایج که در آنها  $p \text{ Value} < 0.05$  بود معنی دار تلقی گردید و نتایج با  $p \text{ Value} > 0.05$  معنی دار محسوب نگردید.

# **فصل چهارم:**

## **یافته ها و نتایج**



#### ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار ۲۴

ساعته عصاره گیاه مرزه:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۲۴ ساعته در جدول ۴-۱ مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که تفاوت توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با گروه های با غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ( $P<0.05$ ). همچنین گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۵۰ معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ )، همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ).

جدول ۴-۱- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته

عصاره گیاه مرزه

غلظت عصاره الکلی مرزه (تیمار ۲۴ ساعته)	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانای ی زیستی سلولها)	91±5.9	17±7.6	80.96±8.2	79.5±9.84	69.2±6.7	65.46±10.1

۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه

مرزه:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۳۶ ساعته در جدول ۴-۲

۲ مشاهده می شود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه ها (گروه

های با غلظت های ۲۵ , ۵۰ , ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت

۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم



بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P<0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ ) همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نبوده ( $P>0.05$ ) و نسبت گروه ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ).

جدول ۴-۲- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو ۳۶ ساعته عصاره گیاه مرزه

غلظت عصاره الکلی مرزه (تیمار ۳۶ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانایی زیستی سلولها)	75.2±5.9	17±7.6	55.76±7.34	55±3.85	50.7±4.9	66.93±16.4

#### ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۲۴ ساعته

##### عصاره گیاه مرزه:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۲۴ ساعته در جدول ۴-۱ مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که تفاوت توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با گروه های با غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ( $P<0.05$ ). همچنین گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ )، گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۵۰ معنی دار نمی باشد ( $P>0.05$ )، همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه های با غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P<0.05$ ).

جدول ۳-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره

گیاه مرزه

غلظت عصاره الکلی مرزه (تیمار ۲۴ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها)	89±4.8	20±5.8	82.56±5.1	82.67±7.36	66.9±5.5	65.56±7.23

#### ۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلول ها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶

##### ساعته عصاره گیاه مرزه:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار ۳۶ ساعته در جدول ۴-۲ مشاهده می شود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروه ها (گروه های با غلظت های ۲۵, ۵۰, ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروه ها معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ). گروه با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ( $P < 0.05$ ) و نسبت به گروه با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار نمی باشد ( $P > 0.05$ ), گروه با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ( $P > 0.05$ ) همچنین گروه با غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نبوده ( $P > 0.05$ ) و نسبت گروه ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴-۴- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار ۳۶ ساعته عصاره گیاه مرزه

غلظت عصاره الکلی مرزه (تیمار ۳۶ ساعته)	گروه کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	گروه کنترل مثبت (دریافت سیس پلاتین)	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ml
درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها)	73.67±4.47	20±5.8	58.33±6.96	53±5.85	52.5±5.58	64.46±20.1

# **فصل پنچ:**

## **بحث و نتیجه گیری**



## ۵-۱- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گیاه مرزه بر سلولهای سرطانی MCF7 :

بررسی سلول های سرطانی در دو تست MTT و تریپان بلو نشان داد که اگر بازه زمان را ثابت و غلظت ها را متغیر در نظر بگیریم. سلول های سرطانی با افزایش غلظت تا اندازه ای دچار آپاپتوز می شوند اما این مقدار آپاپتوز با افزایش میزان غلظت رو به افزایش مینهد به طوری که آمار نشان می دهد آپاپتوز سلولی در غلظت ۲۵ تفاوت معنی داری با گروه کنترل منفی ندارد و ما شاهد آپاپتوز سلولی در این غلظت نیستیم اما در غلظت های ۵۰ به بالا نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری را شاهد هستیم و آپاپتوز سلول های سرطانی رخ می دهد به طوریکه در غلظت ۵۰ نسبت به غلظت ۱۰۰ کمتر اتفاق می افتد ولی غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ تفاوت معنی داری ندارند به بیانی دیگر اگر غلظت عصاره مرزه افزایش یابد میزان آپاپتوز سلولی سلول های سرطانی هم افزایش می یابد ولی از غلظت ۱۰۰ به بالا تفاوت چندانی ندارد تا جایی که در غلظت ۱۰۰ با بیشترین میزان آپاپتوز سلولی مواجه هستیم که با افزایش به غلظت ۱۵۰ تفاوت چندانی نمیکند و تعیین غلظت دقیق با بیشترین میزان اثر به بررسی های تکمیلی نیاز دارد.

## ۵-۲- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گیاه مرزه بر سلولهای سرطانی MCF7 :

عصاره گیاه مرزه بر روی سلول های سرطانی در دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت آزمایش شد. به طوری که در این آزمایش در هر کدام از پلیت ها غلظت ها ثابت در نظر گرفته شد و زمان متغیر بود در این آزمایش در غلظت ۲۵ در زمان ۲۴ ساعت اثرگذاری مشاهده نشد ولی در زمان ۳۶ ساعت تفاوت معنی داری با گروه ۲۴ ساعته و همچنین گروه کنترل منفی داشته که نشان از وقوع آپاپتوز سلولی با افزایش زمان دارد. هم چنین در غلظت ۵۰

و ۱۰۰ بین دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعته تفاوت معنی داری وجود داشت . در غلظت ۱۵۰ نیز تفاوت معنی داری بین دو زمان ۲۴ و ۳۶ ساعته وجود دارد و این یافته ها موکد این است که با افزایش زمان اثرگذاری عصاره نیز افزایش می یابد.

### ۵-۳- نتیجه گیری کلی:

نتیجه گیری می شود که که عصاره اتانولی مرزه اثر آپوتوتیک روی سلول های MCF-7 سرطان سینه دارد که این اثر آپوتوتیک با افزایش غلظت و زمان نسبت مستقیم داشته و با افزایش غلظت و زمان سیتوتوکسیسیته گیاه علیه سلول های MCF-7 افزایش می یابد.

بنابراین گیاه مرزه فعالیت ضد سرطانی علیه سرطان سینه دارد.

### ۵-۴-پیشنهادهات:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر موارد زیر را برای مطالعه بعدی پیشنهاد می کنم:

با توجه به اینکه در غلظت ۲۵ و ۵۰ فقط در زمان ۳۶ ساعت اثر گذار بود و در غلظت های بالا تفاوت معنی داری وجود نداشت پس در آزمایش های تکمیلی می توان غلظت های بیشتری را مورد مطالعه قرار داد تا غلظتی که بیشترین میزان سیتوتوکسیسیته را دارد مشخص شود.



زمان ۲۴ و ۳۶ ساعت تفاوت چشمگیری نسبت به هم داشتند پس می توان متغیر زمان های بیشتری را با توجه به نیمه عمر عصاره در آزمایشات بعدی مد نظر قرار داد تا بهترین زمان برای تاثیر عصاره گیاه مشخص شود.



# **فصل شش:**

## **منابع**



۶-۱- منابع فارسی :

ندارد

۶-۲- منابع انگلیسی :

#### References:

1. Globocan 2008. Fast Stats. Most frequent cancers: both sexes. <file:///globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#BOTH> (Accessed on January 08, 2013).
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63:11.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74.
5. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. J Natl Cancer Inst 2011; 103:714.
6. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 2007; 356:1670.
7. Breen N, A Cronin K, Meissner HI, et al. Reported drop in mammography: is this cause for concern? Cancer 2007; 109:2405.
8. Glass AG, Lacey JV Jr, Carreon JD, Hoover RN. Breast cancer incidence, 1980-2006: combined roles of menopausal hormone therapy,

screening mammography, and estrogen receptor status. J Natl Cancer Inst 2007; 99:1152.

9. Robbins AS, Clarke CA. Regional changes in hormone therapy use and breast cancer incidence in California from 2001 to 2004. J Clin Oncol 2007; 25:3437.

10. Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL, et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. N Engl J Med 2009; 360:573.

11. Marshall SF, Clarke CA, Deapen D, et al. Recent breast cancer incidence trends according to hormone therapy use: the California Teachers Study cohort. Breast Cancer Res 2010; 12:R4.

12. Goya M. Iranian Annual Cancer Registration Report 2003. Ministry of Health and Medical Education, Health Deputy, Center for Disease Control and Prevention. March 2005.

13. Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. Asian Pac J Cancer Prev 2004; 5:24–27.

14. Mohagheghi MA, Mousavi Jarrahi AR, Mortazavi H, et al. Final report of National Cancer Registry modeling in Tehran. Tehran, Shahid Beheshti, and Iran universities of Health and medical services Cancer Institute, and Ministry of Health report 2002; 12:107–116.

15. Naghavi M. Mortality views in 18 Provinces of Iran 2001. Ministry of Health, Deputy to Health Directory, Research and development office, 2003;75.

16. Cady B. Breast cancer in the third millennium. Breast J 2000;6:280 –87.

17. Harirchi I, Ghaem-Maghami F, Karbakhsh M, Moghimi R, Mazaheri H. Patient delay in women presenting with advanced breast Cancer, a study from Iran. *Public Health* 2005; 119:885 – 91.
18. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
19. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 346:883.
20. Zhang Y, Kiel DP, Kreger BE, et al. Bone mass and the risk of breast cancer among postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 336:611.
21. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 289:3243.
22. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 2010; 304:1684.
23. Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute*. 51 (5): 1409–1416.
24. Glodek, Cass, Ph.D., "A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement," 1990, page 68, Michigan Cancer Foundation, Detroit.
25. Levenson, AS; Jordan VC. (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". *Cancer Research*. 57 (15): 3071–3078.

26. Lacroix, M; Leclercq G. (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". *Breast Research and Treatment*. 83 (3): 249–289.
  
27. Ross, DT; Perou CM. (2001). "A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines". *Diseases Markers*. 17 (2): 99–109.
  
28. Charafe-Jauffret, E; Ginestier C; Monville F; Finetti P; Adelaide J; Cervera N; Fekairi S; Xerri L; Jacquemier J; Birnbaum D; Bertucci F. (2006). "Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers". *Oncogene*. 25 (15): 2273–2284.
  
29. Lacroix, M; Toillon RA; Leclercq G. (2006). "P53 and breast cancer, an update". *Endocrine-Related Cancer*. Bioscientifica. 13 (2): 293–325.
  
30. Hedge, I.C., A global survey of the biogeography of the *Labiatae*. In Harley R.M. Reynolds T., *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew, London. (1992) 7-17.
  
31. Hedge, I.C., *Labiatae* of South-west Asia: diversity, distribution and endemism, *Proceedings of the Royal Society of Edinburg* (1986) 89: 23-35.
  
32. Jamzad Z, Ingrouille M and Simmonds MSJ. Three new species of *Nepeta* (Lamiaceae) from Iran. *Taxon* (2003) 52: 93-98.
  
33. Rivera Nunez, D., Obon de Gastro C., Palaeoethnobotany and archaeobotany of the *Labiatae* in Europe and Near East. In Harley, R.M. Reynolds, T., *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew, London. (1992b) 437-454.



34. Richardson P. The chemistry of the Labiatae: An introduction and overview. In: Harley RM and Reynolds T. (Eds.) *Advances in Labiatae Science*. Botanical Garden Kew (1992) 291- 297.
  
35. Lu Y and Yeap-foo L. Polyphenolics of *Salvia*- a review. *Phytochem.* (2002) 59: 117-140.
  
36. Zegorka G and Glowniak K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2001) 26: 179-187.
  
37. Rechinger KH. *Labiatae* In: Flora Iranica, No. 150, Akademische Druch-u. Verlagsanstalt, Austria (1982).
  
38. Naghibi F, Mosaddegh M, Motamed SM and Ghorbani A” Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology” Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2005) 2: 63-79.
39. Baytop, T. Turkce Bitki Adları Sozlugu.A Dictionary of Vernacular Names of Wild;Turk Dil Kurumları Yayınları:Ankara, 1997; 578, pp 163-238.
40. Deans, S. G.; Svoboda, K. P. Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L) essential oil and its constituents.J. Hortic. Sci.1989,64, 205-210.
  
41. Hajhashemi, V.; Sadraei, H.; Ghannadi, A. R.; Mohseni, M.Antispasmodic and anti-diarrhoel effect of *Satureja hortensis* L.essential oil.J. Ethnopharmacol.2000,71, 187-192.

42. Leung, A. Y.; Foster, S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics, second ed.; Wiley: New York, 1996; pp 465-466.
43. Madsen, H. L.; Andersen, L.; Christiansen, L.; Brockhoff, P.; Bertelsen, G. Antioxidative activity of summer savory (*Satureja Hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) in minced, cooked pork meat. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996, 203, 333-338.
44. Zargari, A. Medicinal Plants, fourth ed.; Tehran University Publications: Tehran, 1990; pp 42-45.
45. So'kmen, A.; Jones, B. M.; Erturk, M. The in Vitro antibacterial activity of Turkish plants. *J. Ethnopharmacol.* 1999, 67, 79-86.
46. Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R. Screening for crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 1992, 35, 275-283.
47. M. Gulluce , M. Sokmen , D. Daferera , G. Agar , H. Ozkan , N. Kartal , M. Polissiou , A. Sokmen And F. Sahin . In Vitro Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Herbal Parts and Callus Cultures of *Satureja hortensis* L.
48. Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine* 2003; 10 (Suppl. 04) 31-37.
49. Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, Maggi F. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Planta Med* 2007; 73: 564-566.
50. Gibbons S, Ohlendorf B, Johnsen I. The genus *Hypericum* – a valuable resource of anti-Staphylococcal leads. *Fitoterapia* 2002; 73: 300-304.

51. Bystrov NS, Dobrynin VN, Kolosov MN, Chernov BK, Chervin II. [Structure of the chromophoric part of hyperforin]. Dokl Akad Nauk SSSR 1975; 225: 1327-1328.
52. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. Lancet 1999; 353: 2129.
53. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. Photochem Photobiol 2012; 88: 626-632.
54. Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NG, Bicsboer DD, Bey RF. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. J Med Plants Res 2008; 2: 98-110.
55. Madsen HL, Sørensen B, Skibsted LH, Bertelsen G. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. Food Chem 1998; 63: 173-80.
56. Dorman HJD, Hiltunen R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. Food Chem 2004; 88: 193-9.
57. Vosough-Ghanbari S, Rahimi R, Kharabaf S, Zeinali S, Mohammadirad A, Amini S, et al. Effects of *Satureja khuzestanica* on Serum Glucose, Lipids and Markers of Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. Evid-Based Complement Alternat Med: 2010; 7(4): 465-70.
58. Dikbas N, Kotan R, Dadasoglu F, Sahin F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. Int J Food Microbiol 2008; 124: 179-82.
59. Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee M-B, Jaimand K, Nagasawa H, et al. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L.

essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*.  
Int J Food Microbiol 2008; 123: 228-33.

60. Fathi A, Sahari MA, Barzegar M, Naghdi Badi H . Antioxidant Activity of *Satureja hortensis* L. Essential Oil and its Application in Safflower Oil. Journal of Medicinal Plants, Volume 12, No. 45, Winter 2013
61. Ceker S, Agar G, Alpsoy L, Nardemir G, Kizil HE. Antagonistic effects of *Satureja hortensis* essential oil against AFB1 on human lymphocytes in vitro. Tsitol Genet 2014; 48: 65-71.



Qazvin University of Medical Sciences  
Medical School

**Reg No. 11104**

**Title:** Activity of Artemisia Druncunculus ethanol extract against breast cancer MCF-7 cells

**Supervisor:** Dr. Hossein Piri

**Advisors:** Dr. Hassan Jahani Hashemi

**Author:** Seyyed Sepehr Zeinalabedin Nazari.MD

**Abstract**

**Introduction:** Breast cancer is the most common cancer among women and in recent years has been growing in Iran. Chemical treatments have significant effects of cancer and the use of medicinal plants is one of the most constructive way that creates the least side effects. Tarragon herb Artemisia family due to high levels of antioxidant compounds suitable source for pharmaceutical use to treat and prevent the progression of cancer.

**Methods:** After collecting and drying the samples, extraction process was done by ethanol. MCF-7 cancer cell lines were incubated with different concentrations of ethanol extract for 24 and 36 hours and cell growth inhibition was determined using MTT and trypan blue assay. All the data were analyzed by SPSS software by one-way ANOVA followed by post hoc test TUKEY. In all analyses  $P < 0.05$  was considered significant.

**Results & Conclusion:** In testing MTT and trypan blue cell apoptosis was increased with increasing concentration and time. The ethanol extract of Savory has anti-cancer activity against breast cancer cell line MCF-7 anti-cancer activity.

**Keywords:** Satureja Hortensis , Savory , Breast Cancer , MCF-7 cell line





**Qazvin University of Medical Sciences  
Medical School**

**Thesis for degree of medical doctor**

**Title:**

**Activity of Satureja Hortensis ethanol extract against breast  
camcer MCF-7 cells**

**Supervisor:**

**Dr. Hossein Piri**

**Advisors:**

**Dr. Hassan Jahani Hashemi**

**By:**

**Seyyed Sepehr Zeinalabedin Nazari.MD**

**Reg No.11104**

**Year:  
2017**

